

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Aneta Miklošínová

INTERFERENCEČNÍ STUDIE PŘI STANOVENÍ HEPARINU

Study of Interferents in Heparin Determination

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Jakub Hraníček, Ph.D.

Praha 2015

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně, a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, dne 22.5.2015

Podpis_____

Abstrakt

Tato práce byla zaměřena na studium vlivu vybraných interferentů při stanovení heparinu v biologické matrici (krevní plasma a moč). K tomuto účelu byla použita technika sekvenční injekční analýzy (SIA) se spektrofotometrickou detekcí. Měření byla nejprve prováděna staticky na spektrofotometru a následně pomocí SIA.

Heparin je možné stanovit na základě jeho interakce s methylenovou modří. Tato interakce způsobuje pokles absorbance methylenové modři v místě jejího absorpčního maxima. Pokles je pak úměrný koncentraci heparinu.

Nejprve byla provedena optimalizace a kalibrace methylenové modři a heparinu. Byla vybrána koncentrace methylenové modři $3 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a koncentrace heparinu $1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ a to jak pro statické uspořádání tak i pro průtokové. Absorpční maximum methylenové modři bylo nalezeno při vlnové délce 665 nm.

Dále byly testovány vybrané složky krevní plasmy ve vodných roztocích. Z těchto měření se jako ideální pro testování interferencí heparinu projevil chlorid sodný jako majoritní složka krevní plasmy i moči. Bylo použito 50, 100, 150 a 200 % průměru koncentrací chloridových a sodných iontů v plasmě. Z měření bylo zjištěno, že chlorid sodný potlačuje signál heparinu.

Při aplikaci na reálné vzorky krevní plasmy a moči však bylo zjištěno, že složitá biologická matrice neumožňuje přímé stanovení interferentů heparinu metodou SIA.

Klíčová slova

Heparin

Methylenová modř

Sekvenční injekční analýza

Interferenty heparinu

Poděkování

Můj velký dík patří především mému školiteli a vedoucímu práce panu doktoru Jakubovi Hraníčkovi za cenné rady v laboratoři i při samotném zpracování, za jeho čas a trpělivost. Dále chci poděkovat své rodině, která mě podporuje nejen při vzdělávání a v neposlední řadě také všem svým přátelům za psychickou i morální podporu.

Obsah

1.	Úvod.....	8
2.	Teoretická část	9
2.1.	Heparin	9
2.1.1.	Struktura a vlastnosti heparinu	9
2.1.2.	Nízkomolekulární hepariny	10
2.1.3.	Mechanismus působení heparinů	10
2.2.	Krevní plasma a její složení.....	11
2.2.1.	Anorganické látky.....	11
2.2.2.	Organické látky.....	12
2.3.	Methylenová modř.....	12
2.3.1.	Specifikace.....	12
2.3.2.	Interakce MM s heparinem.....	13
2.4.	Sekvenční injekční analýza (SIA)	14
2.4.1.	Specifikace a princip SIA	14
2.4.2.	SIA Lab-on-valve (SIA-LOV).....	14
2.5.	UV/Vis spektrofotometrie	15
2.5.1.	Princip metody.....	15
2.5.2.	Instrumentace metody.....	15
2.5.3.	Analytická aplikace	16
2.5.4.	Omezení Lambert-Beerova zákona	16
3.	Experimentální část	16
3.1.	Použité chemikálie.....	17
3.2.	Použité přístroje.....	17
3.3.	Použitá aparatura	17
3.4.	Předúprava vzorku plasmy	19
3.5.	Zpracování dat	19
3.5.1.	Statistické nástroje.....	19

3.5.1.1.	Aritmetický průměr	19
3.5.1.2.	Medián.....	19
3.5.1.3.	Rozptyl a směrodatná odchylka	20
3.5.1.4.	Limit detekce a limit stanovitelnosti	20
4.	Výsledky a diskuze	21
4.1.	Statické uspořádání.....	21
4.1.1.	Absorpční spektra methylenové modři.....	21
4.1.2.	Vliv interferentů na stanovení heparinu	24
4.1.3.	Měření chloridu sodného v roztoku methylenové modři a heparinu.....	27
4.2.	SIA uspořádání	28
4.2.1.	Kalibrační řada methylenové modři	28
4.2.2.	Kalibrační řada heparinu	28
4.2.3.	Limit stanovitelnosti a limit detekce heparinu	29
4.2.4.	Měření methylenové modři, chloridu sodného a heparinu v různých kombinacích	30
4.2.5.	Měření reálných vzorků.....	31
5.	Závěr	34

Seznam zkratek a symbolů

AT	Antitrombin III
Hepa	Heparin
IU	(International unit) mezinárodní měrná jednotka pro množství účinné látky
LMWH	(Low molecular weight heparin) nízkomolekulární heparin
LOD	(Limit of Detection) limit detekce
LOQ	(Limit of Quantification) limit stanovitelnosti
MM	Methylenová modř
SIA	(Sequential injection analysis) sekvenční injekční analýza
SIA-LOV	(SIA Lab-on-Valve) verze sekvenční injekční analýzy, kde detekce probíhá přímo na ventilu
UFH	(Unfractionated heparin) nefrakciovaný heparin
A	Absorbance
\bar{x}	Aritmetický průměr
c	Koncentrace [$\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$], [$\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}$]
\hat{x}	Medián
ΔA	Rozdíl absorbance roztoku samotného barviva a připraveným roztokem
s	Směrodatná odchylka
λ	Vlnová délka [nm]

1. Úvod

Heparin je důležitým antikoagulantem využívaným při léčbě onemocnění srážlivosti krve. Nesprávné dávkování však může mít vážné následky, neboť předávkování heparinem může v krajním případě způsobit i smrt. Proto je rychlá a nenákladná detekce tohoto léčiva v lidském organismu velmi důležitá. Stanovením heparinu se zabývalo již mnoho prací a využívaly k tomu různé metody – Ramanovu spektrometrii, průtokovou injekční analýzu, voltametrii, enzymatické stanovení, spektrofotometrické stanovení i další metody.

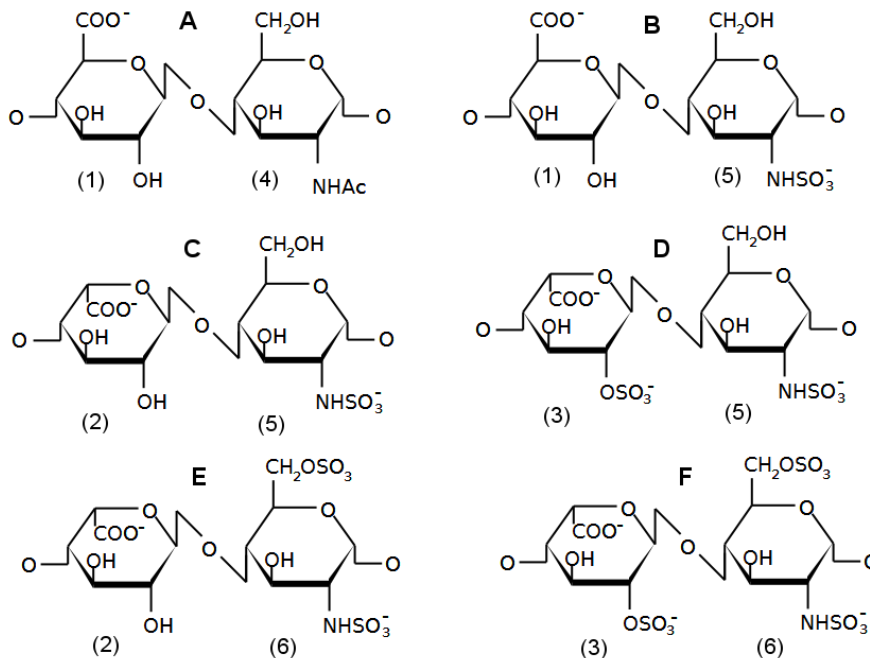
Bylo ovšem zjištěno, že při spektrofotometrickém stanovení heparinu v plasmě pomocí fenothiazinových barviv dochází k rušení signálu, resp. ke snížení míry poklesu absorbance methylenové modři v přítomnosti heparinu a bez něj. Cílem této bakalářské práce bylo zjistit, které látky z lidské krevní plasmy tento jev způsobují. Specializace práce byla hlavně na anorganické látky, tedy anionty a kationty. Nalezené ionty pak byly aplikovány na vzorky biologické matrice, kterou reprezentovala lidská krevní plasma a lidská moč. Byl kladen důraz na to, aby vzorek nemusel být před analýzou složitě upravován. Metodou pro tuto studii byla zvolena sekvenční injekční analýza, pro její výhody plynoucí z časové nenáročnosti jednotlivých analýz, malou spotřebu reakčních činidel a možnou automatizaci procesu.

2. Teoretická část

2.1. Heparin

2.1.1. Struktura a vlastnosti heparinu

Heparin patří do skupiny heterogenních aniontových mukopolysacharidů, které se jinak nazývají glykosaminoglykany¹. Nachází se hlavně v žírných buňkách dále pak v játrech a plicích a je důležitým inhibitorem srážení krve (antikoagulant)^{2,3}. Skládá se z opakujících se jednotek sulfatovaných disacharidů, z nichž jsou některé zobrazené níže (Obr. 2.1). Reaguje s kationtovými barvivy (jako je například methylenová modř, Azur A a Azur B) a zároveň při interakci heparinu a barviva ve vodném roztoku nastane změna absorpčního spektra daného barviva⁴. Tento efekt se nazývá metachromasie a bývá využíván při studiu heparinu a jiných glykosaminoglykanů. Heparin se využívá ve dvou formách, jako nefrakcionovaný heparin (UFH) a nízkomolekulární hepariny (LMWH). Molekulová hmotnost se pohybuje v rozmezí 3 až 20 kDa, podle typu heparinu⁵. Nefrakcionovaný heparin se získává extrakcí ze sliznic poražených zvířat (např. z vepřových střev či plic skotu), nízkomolekulární hepariny jsou obvykle uměle připravené⁶.



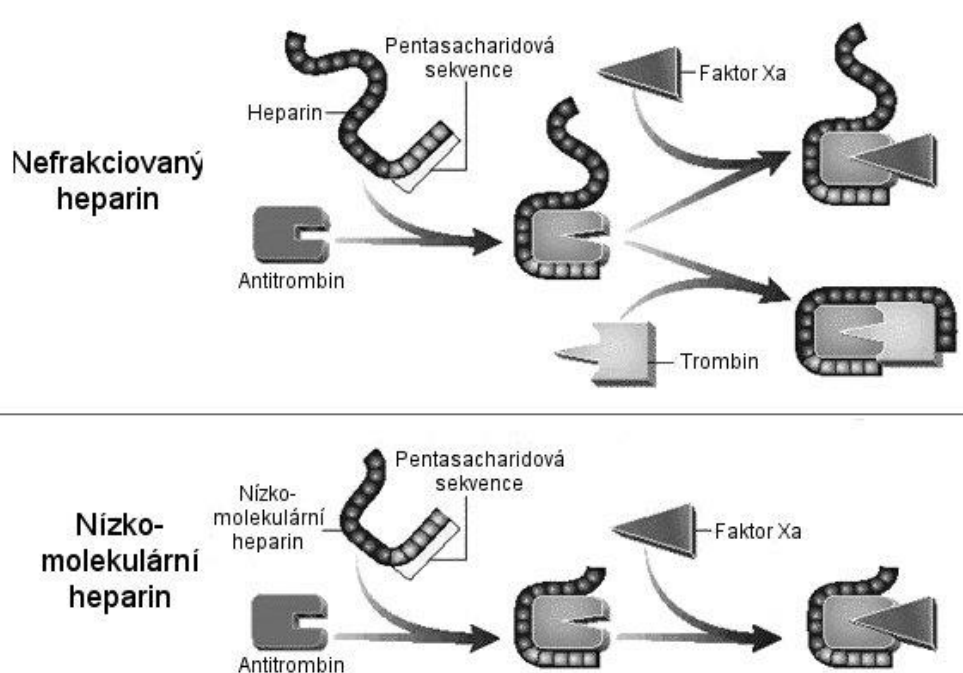
Obr. 2.1 Běžně se vyskytující disacharidové jednotky heparinu. (1) β -D-glukuronová kyselina; (2) α -L-iduronová kyselina; (3) 2-O-sulfo- α -L-iduronová kyselina; (4) 2-deoxy-2-acetamido- α -D-glukopyranosyl; (5) 2-deoxy-2-sulfamido- α -D-glukopyranosyl; (6) 2-deoxy-2-sulfamido- α -D-glukopyranosyl-6-O-sulfát. Nejběžněji se v heparinu vyskytuje jednotka složená z 2-O-sulfatované iduronové kyseliny a 6-O-sulfatovaného, N-sulfatovaného glukosaminu (F)

2.1.2. Nízkomolekulární hepariny

Nízkomolekulární hepariny jsou odvozeny od nefrakcionovaného heparinu. Získávají se chemickou nebo enzymatickou depolymerizací⁷, kdy je původní molekula zredukována přibližně na třetinu původní délky⁸. Mezi nízkomolekulární hepariny patří nadroparin, enoxaparin, dalteparin, parnaparin, reviparin a sulodexid. Jejich molekulová hmotnost se pohybuje od 2 do 9 kDa. Jsou obecně výhodnější než vysokomolekulární hepariny – mají lepší antikoagulační účinek a vykazují méně nežádoucích účinků^{9,10}.

2.1.3. Mechanismus působení heparinů

Antikoagulační aktivita nefrakcionovaného heparinu je závislá na přítomnosti specifických inaktivátorů trombinu, konkrétně na antitrombinu III (AT). Při navázání heparinu na AT se změní jeho konformace, což vede ke zvýšení flexibility jeho reaktivního místa. Takto aktivovaný AT a jiné proteázy (zejména faktor Xa) zabraňují vzniku nerozpustného fibrinu a tím zabraňují srážení krve¹¹. Mechanismus účinku nízkomolekulárních heparinů je jiný. Silně působí zejména proti faktoru Xa, a pouze v malé míře na AT, působí tedy v rané fázi srážení krve¹². U obou typů je interakce s AT zprostředkována pomocí unikátních pentasacharidových sekvencí, které jsou náhodně rozmístěny na heparinovém řetězci (Obr. 2.2 str. 11) Průměrně třetina řetězce nefrakcionovaného heparinu obsahuje pentasacharidovou sekvenci. U nízkomolekulárních heparinů je to pouze 15 – 25 % řetězce⁶.



Obr. 2.2 Mechanismus působení nefrakciovaného heparinu a rozdíl oproti mechanismu působení nízkomolekulárního heparinu.

2.2. Krevní plasma a její složení

Krevní plasma je průhledná, lehce nažloutlá kapalina. Skládá se z 92 % vody, 7,1 % bílkovin a 0,9 % solí¹³. Plasma se získává centrifugací plné krve, do které se následně přidávají protisrážlivé faktory, které v ní zůstávají. Krevní sérum je těchto faktorů zbaveno, jinak se složením od plasmy příliš neliší¹⁴.

2.2.1. Anorganické látky

Mezi anorganické látky rozpuštěné v krevní plasmě patří především ionty. Nejvýznamnější z hlediska množství jsou chloridové a sodné ionty. Další důležité ionty jsou hydrogenuhličitanové anionty a draselné a vápenaté kationty¹⁵. Sodné ionty se podílejí na udržování osmotického tlaku, regulují objem vody v nitrobuněčném a mimobuněčném prostoru. Chloridové anionty jsou důležité pro udržování objemu plasmy a pH a hydrogenuhličitanové ionty tvoří hlavní pufrací systém krve a zajišťují transport oxidu uhličitého z krve do plic a následně ven z těla¹⁶. Další významné ionty a anorganické látky jsou uvedeny v Tab. 2.1 str. 12.

2.2.2. Organické látky

Velkou část krevní plasmy tvoří bílkoviny, jejichž koncentrace nabývá hodnot mezi 64 až 82 g·dm⁻³. Tradičně se rozděluje na albumin, globuliny a fibrinogen. Z hlediska koncentrace je nejvýznamnější bílkovinou albumin (v plasmě je ho obsaženo 30 až 50 g·dm⁻³)¹⁷. Globuliny mají transportní funkci a hrají klíčovou roli v koagulačních procesech. Dále jsou nedílnou součástí imunitního systému. Fibrinogen hraje hlavní roli v zástavě krvácení, je ústředním hemokoagulačním faktorem¹⁶. Mezi nebílkovinné organické složky řadíme např. energetické substráty, hormony a odpadní produkty různých metabolických pochodů¹³. Vybrané z nich jsou uvedeny Tab. 2.1 (vpravo).

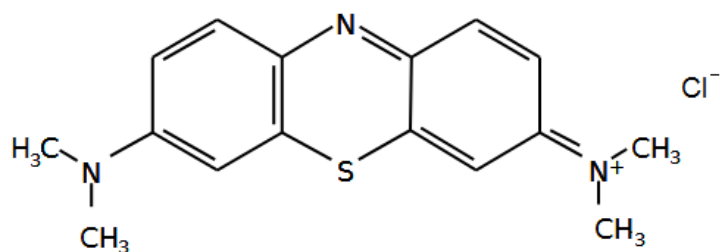
Tab. 2.1 Vybrané anorganické látky (vlevo) a nebílkovinné organické látky (vpravo) s uvedenými přibližnými hodnotami koncentrací, v jakých se v plasmě vyskytují. Zdroj¹⁷

Látka	c, mmol dm ⁻³	Látka	c, mmol dm ⁻³
Na ⁺	142	močovina	5,3
Cl ⁻	102,5	glukóza	4,7
HCO ₃ ⁻	24	cholesterol	4,35
K ⁺	4,35	aminokyseliny	3,1
Ca ²⁺	2,38	laktát	1,39
Mg ²⁺	0,8	triacylglyceroly	1,15
I	0,45	amoniak	0,117
PO ₄ ³⁻	0,38	kreatin	0,08
Fe	0,019		
Cu	0,017		

2.3. Methylenová modř

2.3.1. Specifikace

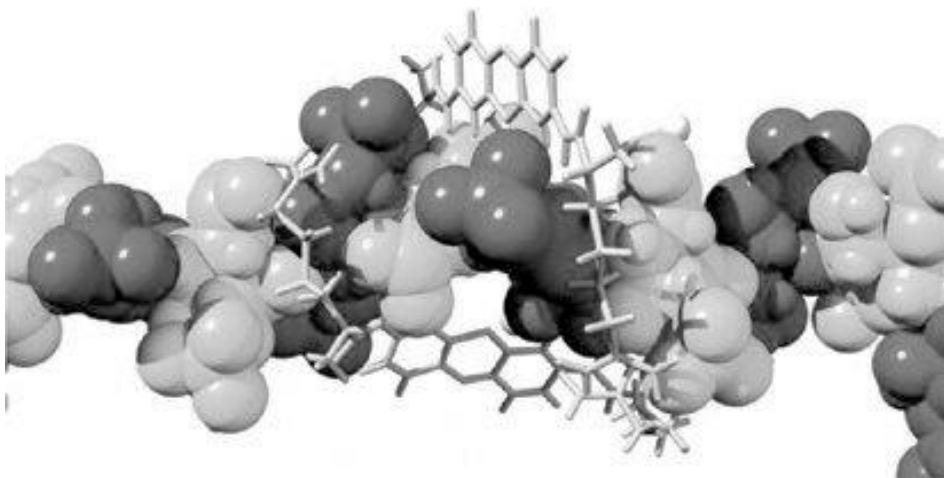
Methylenová modř (systematicky 3,7-bis(dimethylamino)-feno-thiazin-5-ium-chlorid) je tmavě modrá až tmavě zelená krystalická látka¹⁸. Patří mezi aniontová feno-thiazinová barviva a je rozpustná ve vodě a v chloroformu, běžně se vyskytuje v podobě trihydrátu¹⁹. Používá se jako bakteriologické barvivo, indikátor při oxidačně-redukčních titracích a pro lékařské účely, např. jako antidotum při otravě kyanidy a také jako desinfekce při veterinárních úkonech²⁰. Strukturní vzorec methylenové modři je na Obr. 2.3 str. 13.



Obr. 2.3 Strukturní vzorec methylenové modři

2.3.2. Interakce MM s heparinem

Pokud se podíváme na strukturní vzorce methylenové modři (Obr. 2.3) a heparinu (Obr. 2.1 str. 9) zjistíme, že heparin je díky množství sulfátových a karboxylových skupin záporně nabitý, zatímco methylenová modř nese kladný náboj. Interakce mezi těmito látkami je nekovalentní a je založena na elektrostatických a Van der Waalsových silách^{21,22}. Tato interakce způsobuje jev zvaný metachromasie, který je zmíněn v kapitole 2.1.1. Schéma interakce je na Obr. 2.4.

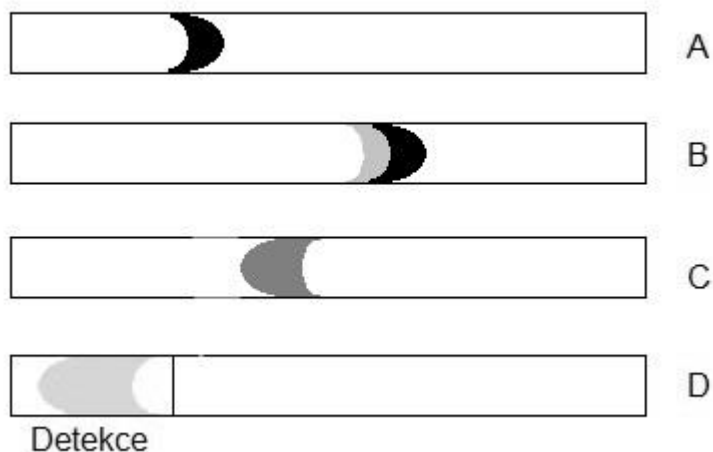


Obr. 2.4 Schéma interakce mezi methylenovou modří a heparinem. Interakce je nekovalentní, zprostředkována hlavně elektrostatickými a Van der Waalsovými interakcemi mezi záporně nabitými sulfátovými skupinami heparinu a místem kladného náboje methylenové modři.

2.4. Sekvenční injekční analýza (SIA)

2.4.1. Specifikace a princip SIA

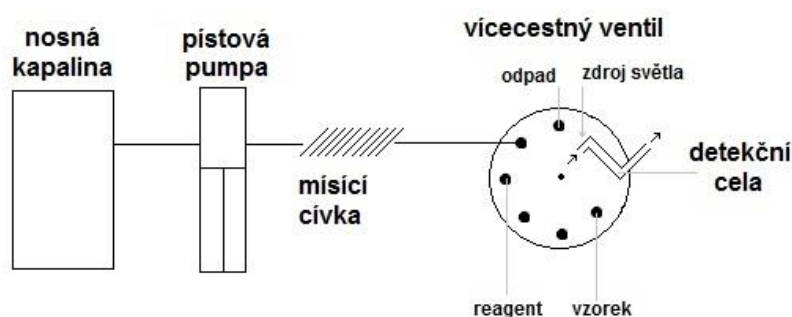
Sekvenční analýza je druhou generací technik průtokové injekční analýzy. Na rozdíl od průtokové analýzy, sekvenční analýza spotřebovává mnohem méně reakčních činidel a produkuje méně odpadu²³. Sekvenční analýza je plně programovatelná a umožňuje obousměrný tok přesně řízený počítačem. Jedna z mála nevýhod sekvenční analýzy je menší počet analyzovatelných vzorků za jednotku času a umožňuje smíchat se vzorkem pouze tři různé reagenty při stejné efektivitě²⁴. Všechny průtokové injekční techniky jsou založeny na rozmývání zóny vzorku v aparatuře, která postupně reaguje s přidávanými činidly a pohybuje se směrem k detektoru²⁵. Schéma procesu je na Obr. 2.5. Existují dva typy procesů, které umožňují smíchání vzorku s reakčním činidlem: axiální difuze a radiální difuze²⁶. Při nadávkování vzorku jako prvním a činidlem jako druhým, reagent proniká do zóny vzorku axiální difuzí a jako spojená zóna se pohybují dále aparaturou proti proudu. Po směru toku prochází reakční směs skrz klikatou cestu reakční cívky, kde se promíchá díky radiální i axiální difuzi. V detekční cele je již difuze dokončena a vzorek s činidlem jsou přeměněny na produkt²⁵.



Obr. 2.5 Schéma principu fungování SIA: (A) Nadávkování vzorku, který je unášen po směru toku směrem k mísící cívce. (B) Nadávkování činidla bezprostředně po dávkování vzorku. (C) Po nasátí činidel se tok obrátí a reagent se vzorkem jsou promíchány v mísící cívce, tím dojde rychleji ke vzniku žádoucího produktu. (D) Vzniklé množství výsledného produktu pak dále putuje do detekční cely, kde je detegováno.

2.4.2. SIA Lab-on-valve (SIA-LOV)

SIA-LOV je třetí generací průtokových technik. Jejím cílem je pojmout všechny nutné komponenty a operace, včetně detekčního zařízení na jeden malý ventil integrovaný v aparatuře²⁷. Výhodou tohoto uspořádání je jeho kompaktnost a stálá poloha všech pracovních kanálů vzorku, což zajišťuje opakovatelnost jednotlivých operací a možnost libovolného míchání činidel²⁸. SIA-LOV také umožňuje předúpravy vzorků on-line a je možné ji miniaturizovat a kombinovat s dalšími technikami, jako je například extrakce na pevné fázi (SPE) a jiné prekoncentrační metody²⁹. Schéma možného uspořádání je na Obr. 2.6.



Obr. 2.6 Schéma možného uspořádání SI-LOV. Celý systém může být ovládán počítačem, propojen s dalšími komponenty jako např. autosampler, peristaltická pumpa atd. a být plně automatizován.

2.5. UV/Vis spektrofotometrie

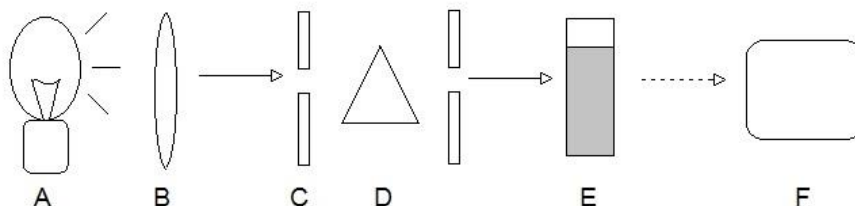
2.5.1. Princip metody

Principem UV/Vis spektrofotometrie je absorpce ultrafialového a viditelného záření v rozsahu vlnových délek cca 200 až 800 nm. Při absorpci dochází k excitaci valenčních elektronů, které jsou součástí molekulových orbitalů³⁰. Fotony záření z UV a viditelné oblasti mají dostatečnou energii k tomu, aby excitovaly vibrační i rotační stavy molekuly. Výsledné spektrum je pásové, protože jednotlivé přechody zpravidla splývají³¹.

2.5.2. Instrumentace metody

Základní součásti přístroje pro měření absorpčních spekter jsou zdroj světla, monochromátor, kyveta s roztokem a detektor záření. Jako zdroje zářivé energie se běžně používají halogenové nebo wolframové žárovky pro viditelnou oblast záření a deuteriové

výbojky pro ultrafialovou oblast. Běžně používané monochromátory jsou hranolové nebo mřížkové. Jejich úkolem je propustit z polychromatického záření pouze zvolenou vlnovou délku. Kyveta s roztokem zase tvoří absorpční prostředí, kterým prochází paprsek světla. Pro oblast viditelného záření se používají průhledné skleněné nebo plastové kyvety, pro UV oblast křemenné kyvety, které neabsorbují v UV ani viditelné oblasti. Pro registraci záření se používají fotoelektrické detektory, jako např. fotonka nebo fotonásobič. Obvykle se měří transmittance nebo absorbance³². Obecné schéma je na Obr. 2.7.



Obr. 2.7 Zjednodušené schéma spektrofotometru pro ultrafialovou a viditelnou oblast záření. (A) zdroj záření, (B) čočka, (C) štěrbina, (D) monochromátor, (E) kyveta s roztokem, (F) detektor záření

2.5.3. Analytická aplikace

Analýzu výsledků poskytnutých spektrofotometrem lze provést na základě platnosti Lambertova-Beerova zákona (rov. 2.1)

$$A = -\log \frac{\Phi}{\Phi_0} = -\log T = \varepsilon_{\lambda} c l \quad 2-1$$

Kde A je absorbance, Φ_0 intenzita paprsku před interakcí s roztokem [%], Φ intenzita paprsku po interakci s roztokem [%], T je transmittance, ε molární absorpční koeficient [$\text{dm}^3/(\text{cm} \cdot \text{mol})$], c koncentrace [$\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$] a l délka kyvety [cm](cit. ³³).

Míra absorbance látky nám tedy dává kvantitativní informaci. Podle počtu jejích energetických hladin látka absorbuje záření o různých frekvencích. Soubor vlnových délek záření, které látka pohltila, se nazývá absorpční spektrum, a je pro určitou látku charakteristické, můžeme ji tedy na základě spektra identifikovat³¹.

2.5.4. Omezení Lambert-Beerova zákona

Podle Lambertova-Beerova zákona absorbance přímo úměrně závisí na koncentraci. To však platí pouze pro velmi zředěné roztoky (<0,01 mol/l). Ve vysokých koncentracích jsou ionty zodpovědné za absorpci světla příliš blízko u sebe a může docházet k interakci mezi molekulami, tvorbě vodíkových vazeb apod. To může ovlivnit prostředí analytu a tím i jeho absorbanci³⁴.

3. Experimentální část

3.1. Použité chemikálie

Heparin 25 000 IU/5 ml, injekční roztok, Heparinum natricum (Sandoz)

Methylenová modř trihydrát ($\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{SCl} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) p.a. Mr = 373,90 (Lachema Neratovice)

Fosforečnan sodný dodecihydrát ($\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) Mr = 380,12 (Lachema Neratovice)

Jodid draselný (KI) p.a. Mr = 166,01 (Lachema Neratovice)

D-fruktóza ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) p.a. Mr = 180,16 (Lachema Neratovice)

Hydrogenuhličitan sodný (NaHCO_3) p.a. Mr = 84,01 (Penta Chrudim)

Chlorid vápenatý dihydrát ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) p.a. Mr = 147,02 (Penta Chrudim)

Chlorid sodný (NaCl) p.a. Mr = 58,44 (Lach-ner Neratovice)

Chlorid draselný (KCl) p.a. X (Sigma-Aldrich Chemie GmbH)

Standardní roztok Cu v HNO_3 1000 ± 4 mg/l (Sigma-Aldrich Chemie GmbH)

Standardní roztok Fe v HNO_3 1002 ± 2 mg/l (Merck KGaA)

Standardní roztok Mg v HNO_3 1000 ± 2 mg/l (Merck KGaA)

Standardní roztok K v HNO_3 1005 ± 5 mg/l (Merck KGaA)

Octan zinečnatý dihydrát [$\text{Zn}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$] p.a. Mr = 219,50 (Spolchemie)

Ferrokyanid draselný trihydrát [$\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$] p.a. Mr = 422,41 (Lachema Neratovice)

Lidská krevní plazma (Sigma-Aldrich Chemie GmbH)

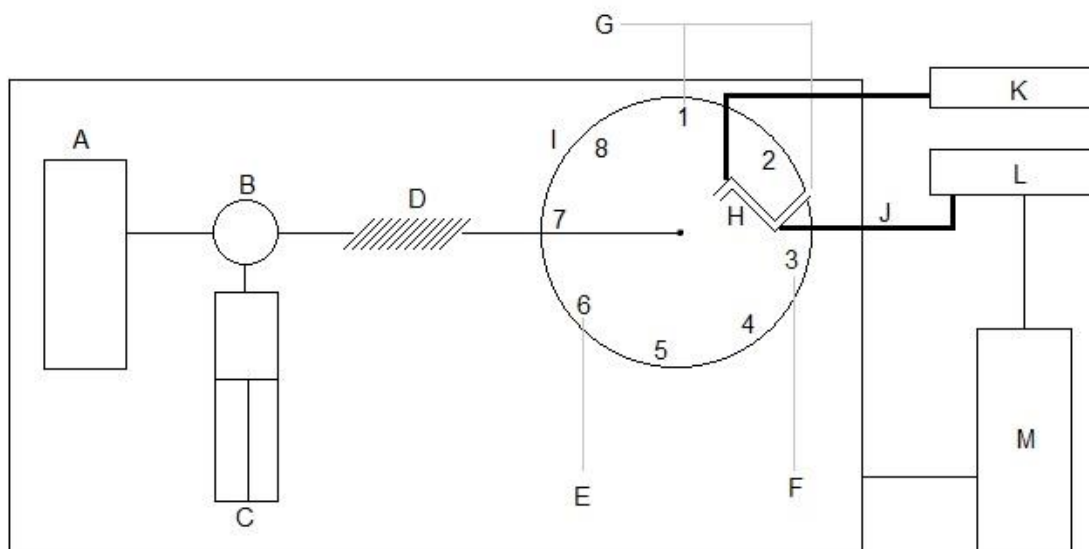
3.2. Použité přístroje

Spektrofotometr Agilent 8453 (Agilent Technologies, USA) ovládaný počítačovým programem UV-Visible ChemStation ver. 9.01

Spektrofotometr HR 4000 (Ocean Optics, USA) se světelným zdrojem DT-MINI-2-GS propojený s průtokovou celou o tloušťce 1 cm optickými vlákny ovládaný počítačovým programem SpectraSuite

Přístroj pro sekvenční injekční analýzu FIALab 3500 (FIALab, USA) s integrovaným detektorem ovládaný počítačovým programem FIALab for Windows ver. 5.0

Byla použita aparatura SIA s uspořádáním Lab-on-valve (LOV) se spektrofotometrickou detekcí. Schéma použité aparatury je zobrazeno na Obr. 3.1. Všechny průtokové cesty v aparatuře byly mezi sebou propojeny teflonovými hadičkami o průměru 0,5 mm, hadička vedoucí od nosné kapaliny do pístové pumpy měla průměr 0,8 mm. Detekce probíhala v detekční cele, která byla součástí osmicestného ventilu a byla spojena se světelným zdrojem optickými vlákny.



Obr. 3.1 Schéma použité SIA aparatury v uspořádání lab-on-valve. (A) Nosná kapalina (deionizovaná voda); (B) dvoucestný přepínací ventil; (C) pístová pumpa; (D) mísící cívka; (E) vzorek, případně deionizovaná voda pro blank; (F) reagent (methylenová modř); (G) odpad; (H) průtoková detekční cela; (I) osmicestný selekční ventil; (J) optická vlákna; (K) světelný zdroj; (L) spektrofotometr; (M) počítač s programem k vyhodnocení dat

V programu FIALab for Windows 5.0 byly vytvořeny příkazy tak, aby analýzy probíhaly následujícím způsobem. Dvoucestný přepínací ventil byl přepnut do polohy OUT (směrem k osmicestnému ventilu) a osmicestný ventil byl přepnut do polohy 3. Dále bylo nasáto do mísící cívky pomocí pístové pumpy 150 μl reagentu (methylenové modři). Po dokončení úkonu byl osmicestný ventil přepnut do polohy 6 a bylo nasáto 150 μl vzorku (případně deionizované vody pro blank). Po dokončení nasávání byl dvoucestný ventil přepnut do polohy IN (směrem k zásobníku s nosnou kapalinou) a pístová pumpa byla doplněna vodou na objem jednoho mililitru. Poté byl přepínací ventil přepnut do polohy OUT, osmicestný ventil byl přepnut do polohy 2 (poloha průtokové cely) a celý objem byl rychlostí 25 $\mu\text{l} \cdot \text{s}^{-1}$ vypuštěn skrz detekční celu a následně do odpadní nádoby. Poté byla pístová pumpa naplněna nosnou kapalinou, kterou byla propláchnuta detekční cela, aby zbytky reakčních činidel nerušily další analýzu. Objemy dávkovaného vzorku a činidla, průtokové rychlosti a reakční časy byly takové, které byly dříve určeny jako optimální³⁵.

Analytickým signálem byl rozdíl absorbance roztoku methylenové modři měřené jako blank a absorbance připraveného roztoku obsahující methylenovou modř s přidavkem analytu.

Všechna měření byla provedena 3krát až 5krát. Z těchto hodnot byl vybrán medián, který byl použit pro další zpracování dat.

3.4. Předúprava vzorku plasmy

Vzorek plasmy bylo nutné zbavit bílkovin. Bylo připraveno 10 ml roztoku octanu zinečnatého o koncentraci $300 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ (Carrezovo činidlo I) a 10 ml roztoku hexakyanoželeznatanu draselného o koncentraci $150 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ (Carrezovo činidlo II). Plasma byla 10krát naředěna na celkový objem 10 ml. Do zkumavky bylo pipetováno 1 ml zředěné krevní plasmy, k tomu bylo přidáno 1 ml Carrezova činidla I a roztok byl důkladně promíchán po dobu 30 sekund. Dále bylo přidáno 1 ml Carrezova činidla II a roztok byl znovu 30 sekund míchán a následně centrifugován, dokud se sraženina neusadila. Supernatant byl odebrán a použit pro měření.

3.5. Zpracování dat

Data ze spektrofotometru byla nejprve vyhodnocena příslušným počítačovým programem, kde byly změřeny výšky píků. K záznamu hodnot a grafů byly použity programy Microsoft Excel 2010 a OriginPro ver. 8.5.

3.5.1. Statistické nástroje

K vyhodnocení naměřených hodnot byly použity následující parametry a výpočty.

3.5.1.1. Aritmetický průměr

Aritmetický průměr (\bar{x}) je nejznámější odhad střední hodnoty, který se počítá jako součet všech hodnot vydělený jejich počtem. Jeho výhodou je především ve snadném výpočtu, nevýhodou je značná citlivost k odlehlým výsledkům³⁶.

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad 3-1$$

3.5.1.2. Medián

Medián(\hat{x}) je prostřední hodnota členů výběru uspořádaných podle velikosti. Odděluje polovinu větších hodnot od poloviny menších. Na rozdíl od aritmetického průměru je necitlivý k extrémním hodnotám, protože závisí na jedné nebo dvou hodnotách z celého výběru a tudíž není zkreslen přítomností chybné extrémní hodnoty³⁷.

3.5.1.3. Rozptyl a směrodatná odchylka

Výběrový rozptyl (s^2) je součet druhých mocnin odchylek od aritmetického průměru vydělený počtem měření. Čím je tato hodnota větší, tím více se hodnoty odchylují od průměru.

$$s^2 = \frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \quad 3-2$$

Směrodatná odchylka (s) je pak druhou odmocninou výběrového rozptylu. Používá nejvíce ze všech nástrojů míry variability souboru. Její výhodou je, že má stejný fyzikální rozměr jako střední hodnota³⁷.

3.5.1.4. Limit detekce a limit stanovitelnosti

Limit detekce (LOD) je takové množství analytu, které způsobí změnu měřeného signálu v rozsahu trojnásobku absolutní hodnoty směrodatné odchylky. Limit stanovitelnosti (LOQ) je nejnižší množství analytu, které je možno kvantifikovat a vypočítá se jako desetinásobek směrodatné odchylky. Obě veličiny jsou tedy závislé především na chybě měření, kterou může reprezentovat směrodatná odchylka nebo tzv. šum³⁸.

4. Výsledky a diskuze

V této kapitole jsou uvedeny výsledky experimentů zaměřené na zkoumání vlivu interferentů na stanovení heparinu. Výsledky jsou rozděleny do dvou hlavních částí, statické uspořádání, kde měření probíhalo na spektrofotometru a průtokové SIA uspořádání, kde měření probíhalo na aparatuře sekvenční injekční analýzy. Statická měření byla prováděna za účelem orientačního zjištění, které látky vyskytující se v krevní plasmě mohou ovlivnit stanovení heparinu. Vybrané ionty pak byly testovány v průtokovém uspořádání SIA a následně byly aplikovány na reálné vzorky krevní plasmy a moči.

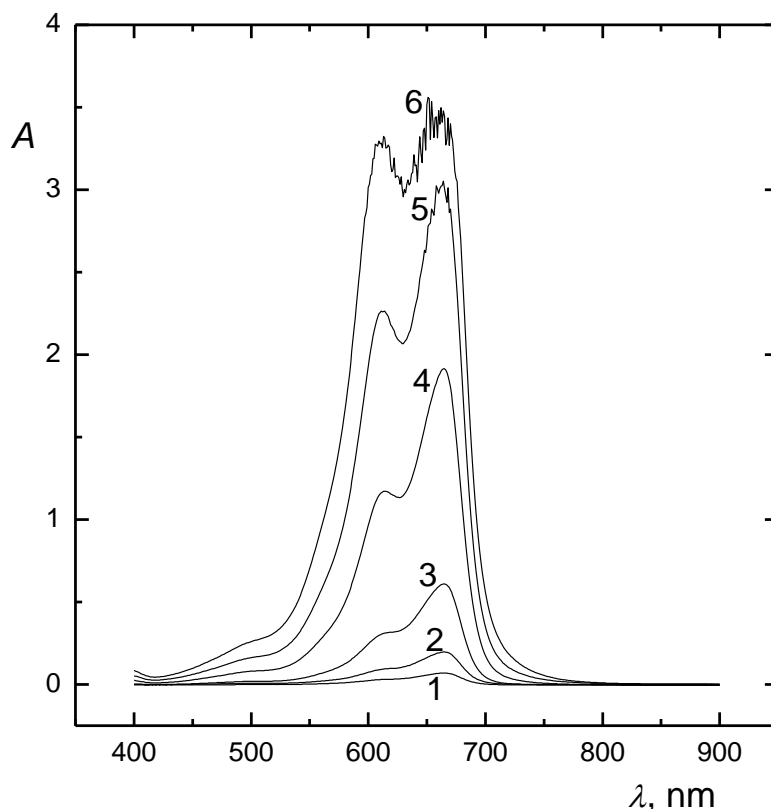
4.1. Statické uspořádání

Ve statické části byly vzorky měřeny na spektrofotometru Agilent 8453, výsledky byly vyhodnoceny programem UV/visible ChemStation a následně zpracovány programem Origin ver. 8.5. Jednotlivé roztoky byly proměřeny v křemenné kyvetě o délce 1,0 cm v rozsahu vlnových délek od 400 do 900 nm s krokem 1 nm.

4.1.1. Absorpční spektra methylenové modři

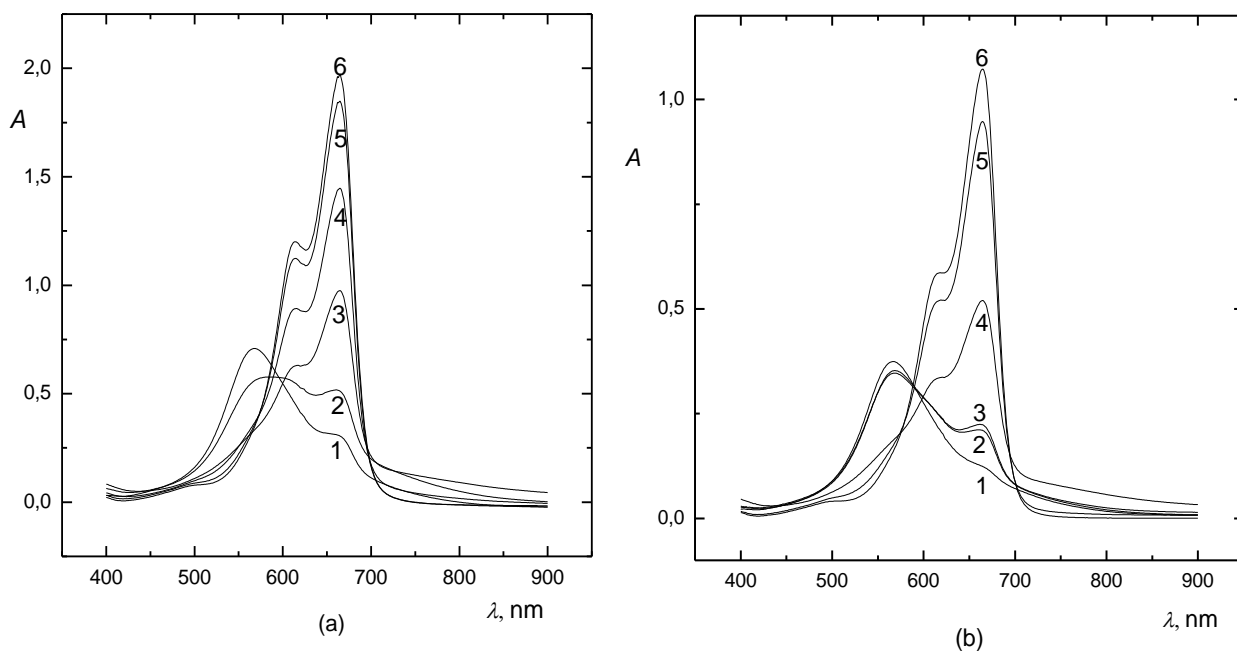
Byla měřena závislost absorbance methylenové modři na její koncentraci, za účelem výběru takové molární koncentrace, která bude poskytovat dostatečný signál při vybrané vlnové délce a zároveň bude spadat do pracovního rozsahu detektoru. Zásobní roztok methylenové modři o koncentraci $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ byl připraven z 18,47 mg pevné methylenové modři do 100ml odměrné baňky. Pro kalibrační řadu byly připraveny pracovní roztoky o koncentracích:

$1 \cdot 10^{-6}$, $3 \cdot 10^{-6}$, $1 \cdot 10^{-5}$, $3 \cdot 10^{-5}$, $6 \cdot 10^{-5}$ a $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Pro další měření byl jako optimální vybrán roztok methylenové modři o koncentraci $3 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, protože poskytuje dostatečnou hodnotu absorbance, a průběh spektra není deformován. Graf s výsledky měření a jednotlivými spektry je na Obr. 4.1 str. 22.

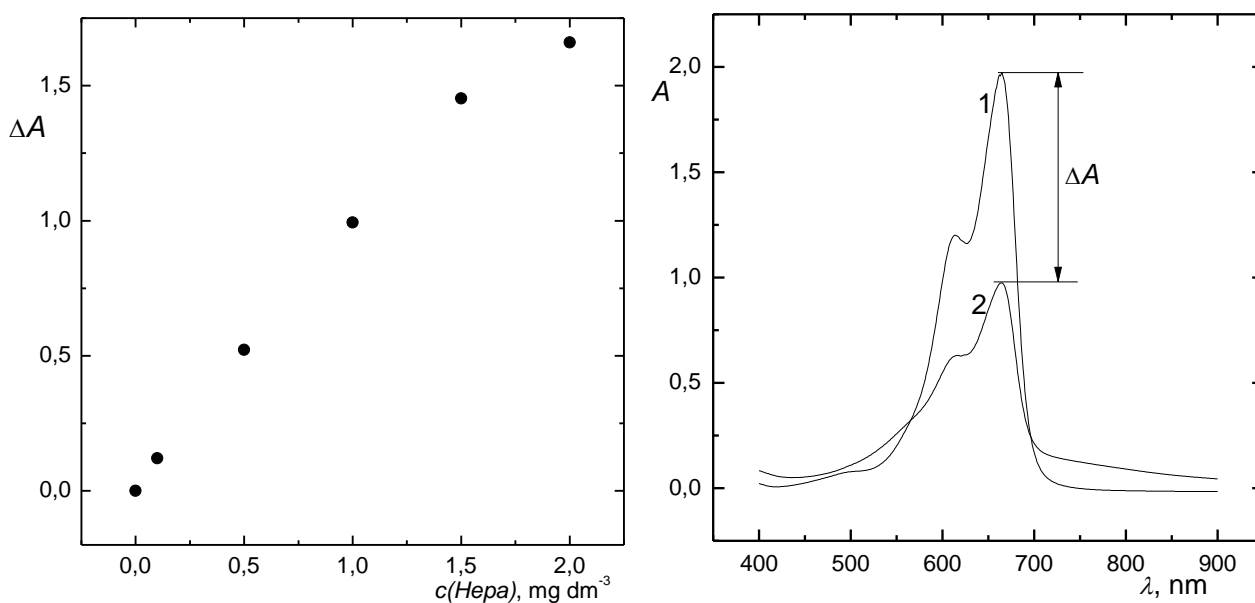


Obr. 4.1 Jednotlivá spektra methylenové modři o koncentracích: $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ (1), $3 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ (2), $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ (3), $3 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ (4), $6 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ (5), $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ (6).

Dále byla měřena změna signálu (absorbance) methylenové modři v přítomnosti heparinu. Bylo připraveno 100 ml zásobního roztoku heparinu, jehož koncentrace byla $100 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$. Pro kalibraci byly připraveny pracovní roztoky methylenové modři s přidavkem heparinu v objemu 10 ml o koncentracích heparinu 0,1; 0,5; 1,0; 1,5 a $2,0 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ a koncentracích methylenové modři $3 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a $1,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Roztok methylenové modři o dané koncentraci sloužil jako reference. Z tohoto měření byla jako optimální kombinace zvolena methylenová modř o koncentraci $3 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a heparin o koncentraci $1,0 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$. Vybraná koncentrace methylenové modři leží v lineární části kalibrační přímky a v kombinaci s heparinem o vybrané koncentraci poskytuje dostatečný pokles absorbance při vlnové délce 665 nm, kde se nachází absorpční maximum methylenové modři. Srovnání spekter methylenové modři o různých koncentracích s přidavky heparinu je na Obr. 4.2, kalibrační přímka a míra poklesu potom na Obr. 4.3, vše str. 23.



Obr. 4.2 Srovnání spekter methylenové modři o koncentraci $3 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ (a) a $1,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ (b). V obou případech byla měřena methylenová modř bez přidavku heparinu (6), a methylenové modři s přidavkem heparinu s koncentrací $0,1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ (1); $0,5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ (2); $1,0 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ (3); $1,5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ (4) a $2 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ (5)



Obr. 4.3 Kalibrační závislost poklesu absorbance s použitím methylenové modři o koncentraci $3 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ na koncentraci heparinu (vlevo); Míra poklesu absorbance (ΔA) mezi čistou methylenovou modří (1) a methylenovou modří s přidavkem heparinu (2) (vpravo).

4.1.2. Vliv interferentů na stanovení heparinu

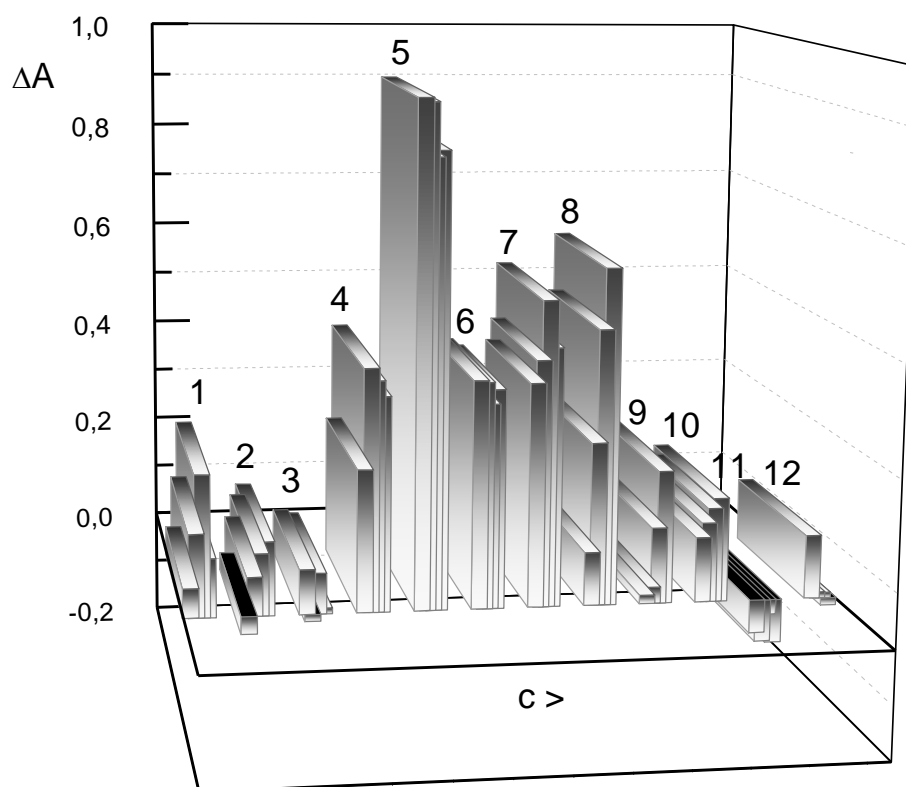
V této části bylo cílem zjistit, zda některé ze složek krevní plasmy mají rušivý vliv na stanovení heparinu pomocí methylenové modři. Ze složek krevní byly vybrány hlavně anorganické ionty a z organických látek fruktóza a močovina. Jako signál byl určen rozdíl absorbancí methylenové modři a připraveného roztoku. Byly použity koncentrace methylenové modři a heparinu vybrané jako optimální v kapitole 4.1.1. K takto připraveným roztokům byly následně přidávány takové objemy jednotlivých zásobních roztoků interferentů, aby jejich finální koncentrace v roztoku methylenové modři a heparinu odpovídala vždy 50%, 100%, 150% a 200% průměru jejich koncentrace v plasmě (Tabulka 2.1 str. 12). Jako reference sloužila samotná methylenová modř (A_2) a methylenová modř s čistým heparinem (A_3). Výsledky měření jsou uvedeny v Tab. 4.1 str. 25.

Tab. 4.1 Výsledky měření při zjišťování vlivu interferentů na stanovení heparinu.
Množství interferentu bylo vždy 50%, 100%, 150% a 200% koncentrace látky v plasmě.

interferent	c (%)	A_I	A_2 (MM)	A_3 (MM+H)	rozdl A_2 a A_3	rozdl A_I a A_2	rozdl A_I a A_3	Potlačení signálu (%)
Ca^{2+}	50	1,323	1,867	1,269	0,598	0,544	0,054	9,0
	100	1,421				0,446	0,152	25,4
	150	1,528				0,339	0,259	43,3
	200	1,376				0,491	0,107	17,9
K^+	50	1,236				0,631	0,033	-5,2
	100	1,340				0,527	0,071	11,9
	150	1,383				0,484	0,114	19,1
	200	1,404				0,463	0,135	22,5
Mg^{2+}	50	1,351				0,516	0,082	13,7
	100	1,256				0,611	0,013	-2,1
	150	1,344				0,523	0,075	12,5
	200	1,280				0,587	0,011	1,8
Na^+	50	1,530				0,337	0,261	43,6
	100	1,713				0,154	0,444	74,2
	150	1,690				0,177	0,421	70,4
	200	1,662				0,205	0,393	65,7
Cl^-	50	1,823				0,109	0,921	89,4
	100	1,816				0,116	0,914	88,7
	150	1,720				0,212	0,818	79,4
	200	1,731				0,201	0,829	80,5
Cu^{2+}	50	1,320				0,612	0,418	40,6
	100	1,316				0,616	0,414	40,2
	150	1,277				0,655	0,375	36,4
	200	1,303				0,629	0,401	38,9
Fe^{2+}	50	1,313	1,932	0,902	1,030	0,619	0,411	39,9
	100	1,355				0,577	0,453	44,0
	150	1,463				0,469	0,561	54,5
	200	1,377				0,555	0,475	46,1
HCO_3^-	50	1,000				0,932	0,098	9,5
	100	1,202				0,730	0,300	29,1
	150	1,409				0,523	0,507	49,2
	200	1,520				0,412	0,618	60,0
PO_4^{3-}	50	0,917				1,012	0,015	1,5
	100	0,932				0,997	0,030	2,9
	150	1,042				0,887	0,140	13,6
	200	1,147				0,782	0,245	23,9
I^-	50	1,022	1,929	0,902	1,027	0,907	0,120	11,7
	100	1,049				0,880	0,147	14,3
	150	1,076				0,853	0,174	16,9
	200	1,094				0,835	0,192	18,7
Urea	50	0,887				1,058	0,062	-6,2
	100	0,871				1,074	0,078	-7,8
	150	0,921				1,024	0,028	-2,8
	200	0,868				1,077	0,081	-8,1
Fruktóza	50	1,067	1,945	0,949	0,996	0,878	0,118	11,8
	100	0,960				0,985	0,011	1,1
	150	0,959				0,986	0,010	1,0
	200	0,935				1,010	0,014	-1,4

Z tabulky 4.1 je patrné, že pouze u draselných, hydrogenuhličitanových a fosforečnanových iontů dochází k potlačování signálu heparinu úměrně koncentraci látky v roztoku. Neznamená to ovšem, že tyto ionty jsou opravdu interferenty, protože zásobní roztoky, z nichž byly připraveny, obsahovaly i sodné nebo chloridové ionty. Pro další měření byl jako interferent heparinu vybrán chlorid sodný z důvodu vysokého obsahu v plasmě, cca $0,122 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Fruktóza naopak se zvyšující se koncentrací zesilovala signál heparinu (roztok methylenové modři a heparinu za přítomnosti fruktózy vykazuje nižší absorbanci než roztok, který obsahuje pouze methylenové modři a heparin). To však mohlo být způsobeno nepatrnou absorpcí světla samotného roztoku ve viditelné oblasti (roztok fruktózy měl lehké světle žluté zabarvení). Rozdíly signálu methylenové modři s heparinem bez a s interferentem jsou pro ilustraci zobrazeny na Obr. 4.4.



Obr. 4.4 Všechny měřené potenciální interferenty heparinu obsažené v krevní plasmě. Pořadí látek je podle míry zastoupení v plasmě od nejvýznamnějších po málo zastoupené. (1) Na⁺; (2) Cl⁻; (3) HCO₃⁻; (4) K⁺; (5) Ca²⁺; (6) PO₄³⁻; (7) Mg²⁺; (8) I⁻; (9) Fe²⁺; (10) Cu²⁺; (11) Urea; (12) Fruktóza

4.1.3. Měření chloridu sodného v roztoku methylenové modři a heparinu

Při tomto měření bylo cílem zjistit, jestli chlorid sodný potlačuje signál heparinu při jeho spektrofotometrickém stanovení. Na spektrofotometru byly nejprve změřeny roztoky obsahující čistou methylenovou modř ($3 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) s přidavkem chloridu sodného (50%, 100%, 150% a 200% průměru koncentrací sodných a chloridových iontů v plasmě) a dále byly měřeny roztoky obsahující methylenovou modř, chlorid sodný a heparin ($1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$). Obě měření byla provedena za stejných podmínek – byly stejné koncentrace všech složek směsí. Byly mezi sebou porovnány jednotlivé koncentrace chloridu sodného s přidavkem heparinu a bez něj. Výsledky měření jsou uvedeny v Tab. 4.2.

Tab. 4.2 Měření vlivu roztoku chloridu sodného v roztoku čisté methylenové modři (a) a methylenové modři s přidavkem heparinu (b).

(a)		(b)		ΔA	Potlačení (%)
c(NaCl), mol/l	A_{665}	c(NaCl), mol/l	A_{665}		
0,000	2,075	0,000	1,245	0,830	100,0
0,061	1,968	0,061	1,694	0,274	67,0
0,122	1,858	0,122	1,857	0,001	99,9
0,183	1,849	0,183	1,835	0,014	98,3
0,249	1,830	0,249	1,791	0,039	95,3

Rozdíl absorbancí čisté methylenové modři (a) a methylenové modři s přidavkem heparinu (b) byl 0,830 jednotek absorbance. Vzhledem k nulovému obsahu chloridu sodného byl tento pokles považován za 100 % a byly k němu vztahovány poklesy signálu ostatních roztoků.

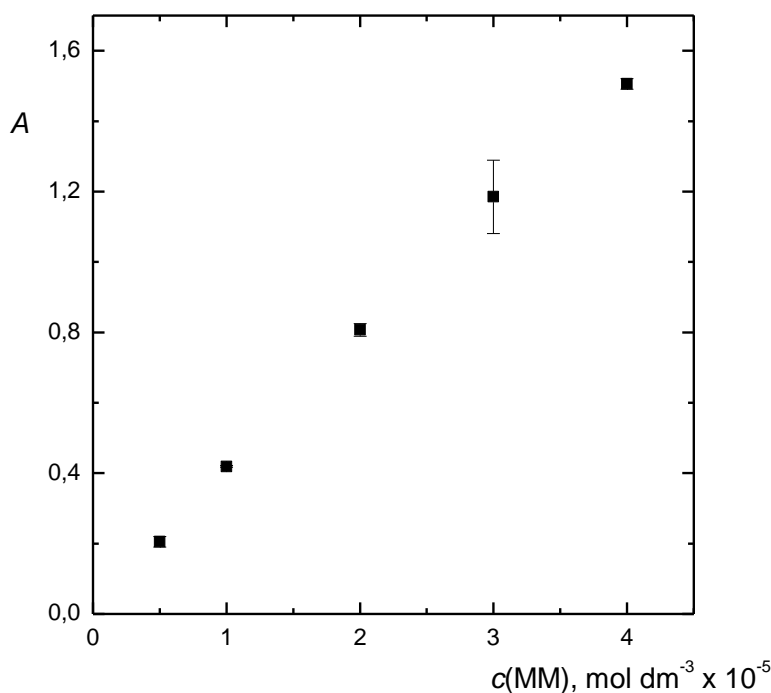
U methylenové modři bez obsahu heparinu je s přibývajícím množstvím chloridu sodného vidět pokles absorbance. Tento pokles mohl být způsoben rozdílnou iontovou silou roztoků.

V roztocích, kde je kromě methylenové modři a chloridu sodného přítomen heparin, je znát narůst absorbancí roztoků oproti nulovému přidavku a potlačení signálu nabývá vysokých hodnot (až 99,9 %). Chlorid sodný tedy potlačuje signál při stanovení heparinu, avšak neúměrně koncentraci přidavku. Nelze však přesně určit, jestli je potlačení signálu způsobeno přítomností látky v roztoku nebo zvýšenou iontovou silou roztoku.

4.2. SIA uspořádání

4.2.1. Kalibrační řada methylenové modři

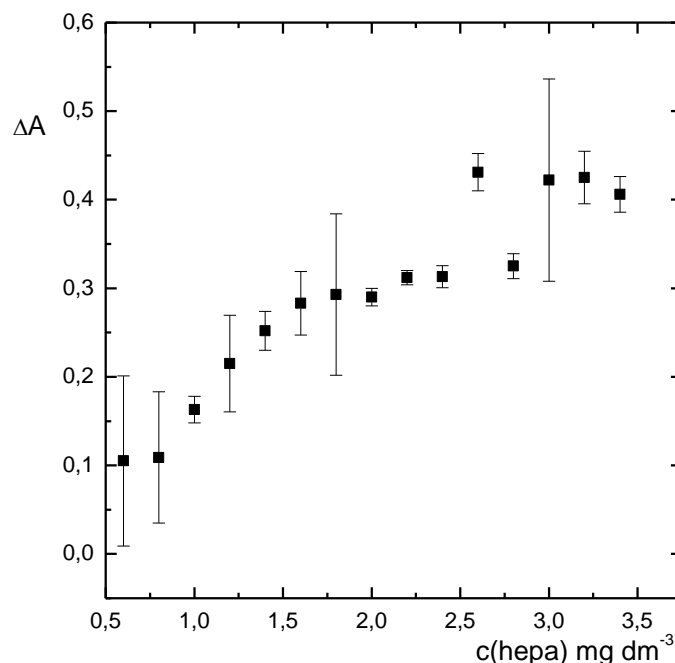
byla měřena kalibrační řada methylenové modři v rozmezí koncentrací $5 \cdot 10^{-6}$ až $4 \cdot 10^{-5}$ $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ za podmínek dříve určených jako optimálních. Měření bylo provedeno za účelem výběru vhodné koncentrace methylenové modři pro stanovení interferentů heparinu metodou SIA. Z tohoto měření byla vybrána koncentrace $3 \cdot 10^{-5}$ $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, protože poskytuje vhodnou hodnotu absorbance při dané vlnové délce. Výsledný kalibrační graf je na Obr. 4.5.



Obr. 4.5 Kalibrační body závislosti absorbance na koncentraci methylenové modři měřené v uspořádání SIA s naznačenou směrodatnou odchylkou.

4.2.2. Kalibrační řada heparinu

Byla zjišťována optimální koncentrace heparinu pro vybranou koncentraci methylenové modři. Byla sestavena kalibrační řada heparinu v rozmezí koncentrací 0,6 až 3,4 $\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}$. Výsledný graf s kalibračními body a naznačenou směrodatnou odchylkou je na Obr. 4.6 str. 29.



Obr. 4.6 Kalibrační body heparinu v rozmezí koncentrací 0,6 až 3,6 $\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}$.
Podmínky měření a koncentrace methylenové modři byly zvoleny dle předchozích měření.

Z grafu vyplývá, že vhodné koncentrace heparinu pro interferenční studii by mohly být 0,8 až 1,6 $\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}$, protože leží v lineární části kalibrační závislosti. S dalšími přidavky heparinu již rozdíly absorbance silně kolísají. Vzhledem k relativně vysokým hodnotám směrodatné odchylky těchto hodnot byla pro další měření podle kalibračních bodů zvolena koncentrace heparinu 1 $\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}$, protože leží v lineární části kalibrační přímky a hodnota její směrodatné odchylky je nejnižší.

4.2.3. Limit stanovitelnosti a limit detekce heparinu

Pro výpočet limitu stanovitelnosti a limitu detekce byla použita kalibrační závislost heparinu uvedená na Obr. 4.6. Signálem byla hodnota absorbance jednotlivých roztoků (rozsah koncentrací heparinu od 0,8 do 1,6 $\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}$). Lineární část této závislosti (rozsah koncentrací heparinu od 0,8 do 1,6 $\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}$) byla proložena kalibrační přímkou, jejíž rovnice byla

$$y = -0,313x + 1,2676 \quad 4-1$$

Heparin o koncentraci 1 $\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ byl pětkrát proměřen za stejných podmínek, za kterých byla proměřena jeho kalibrační řada. Z naměřených absorbancí byly podle rovnice kalibrační přímky vypočteny jednotlivé koncentrace a následně i směrodatná odchylka

těchto hodnot. Limit detekce byl vypočten jako trojnásobek směrodatné odchylky a limit stanovitelnosti jako její desetinásobek. Konkrétní hodnoty jsou uvedeny v Tab. 4.3 str. 30.

Tab. 4.3 Vypočtené hodnoty směrodatné odchylky, limitu stanovitelnosti a limitu detekce pro stanovení heparinu methylenovou modří

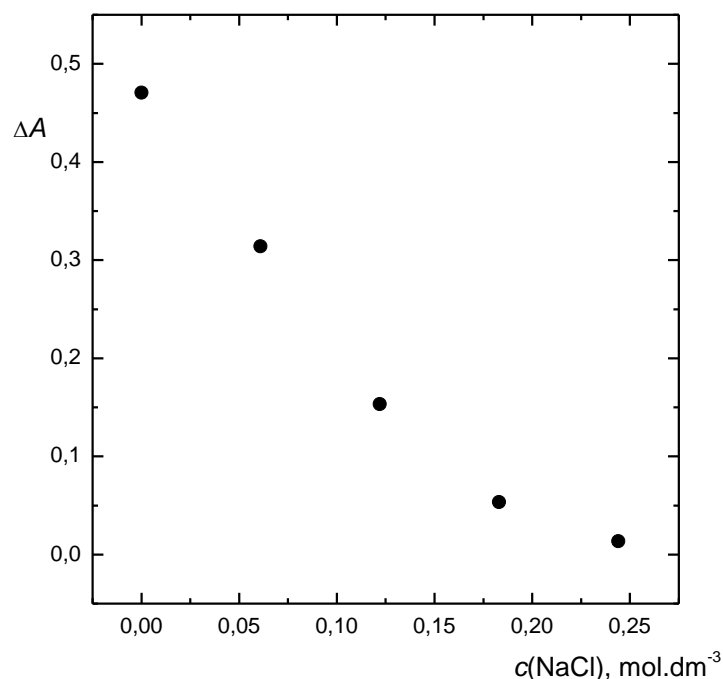
hodnota směrodatné odchylky	limit detekce $\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}$	limit stanovitelnosti $\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}$
0,0266	0,0798	0,266

4.2.4. Měření methylenové modři, chloridu sodného a heparinu v různých kombinacích

Při tomto měření bylo cílem zjistit, jestli je pro interferenční studii výhodnější přidat chlorid sodný k roztoku methylenové modři nebo k roztoku heparinu. Byly použity koncentrace methylenové modři a heparinu, které jsou výše uvedené jako optimální. Koncentrace chloridu sodného byly vždy 0,061; 0,122; 0,183 a 0,244 $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, což odpovídá 50%, 100%, 150% a 200% průměru obsahu chloridových a sodných iontů v plasmě.

V prvním experimentu byly připraveny roztoky methylenové modři s chloridem sodným, roztok heparinu byl připraven zvlášť jako reagent. V druhém experimentu byl chlorid sodný přidán do roztoku heparinu a roztok methylenové byl připraven zvlášť.

Jako vhodná kombinace se projevila methylenová modř připravená zvlášť a chlorid sodný přidávaný přímo do roztoku heparinu. Rozdíl absorbancí připravených roztoků vzhledem k absorbanci methylenové modři s rostoucími koncentracemi chloridu sodného klesal, chlorid sodný tedy rušil stanovení heparinu. Pokles je zobrazen na Obr. 4.7 str. 31. Zároveň toto uspořádání odpovídá skutečnému stanovování heparinu ve vzorku, který je obvykle tvořen komplexní maticí.

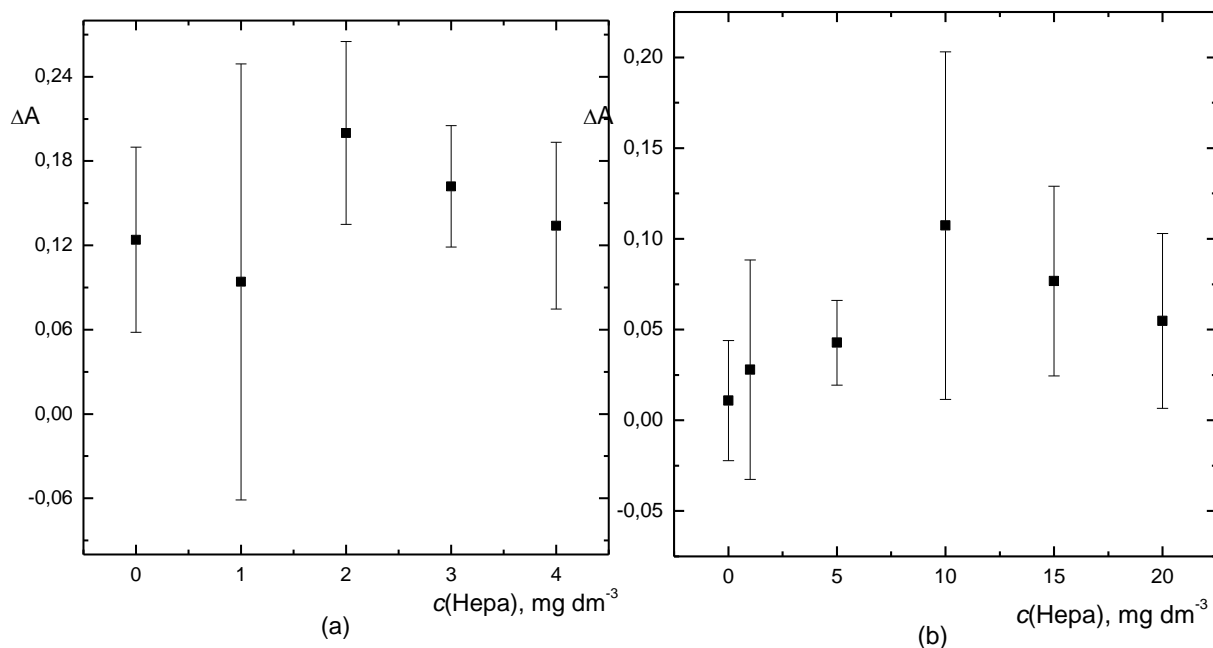


Obr. 4.7 Zobrazení poklesu rozdílu absorbance při měření kombinace heparinu spolu s chloridem sodným a methylenovou modří připravenou zvlášť jako reagent. Koncentrace chloridu sodného odpovídají 50 %, 100 %, 150 % a 200 % průměru obsahu chloridových a sodných iontů v plasmě.

4.2.5. Měření reálných vzorků

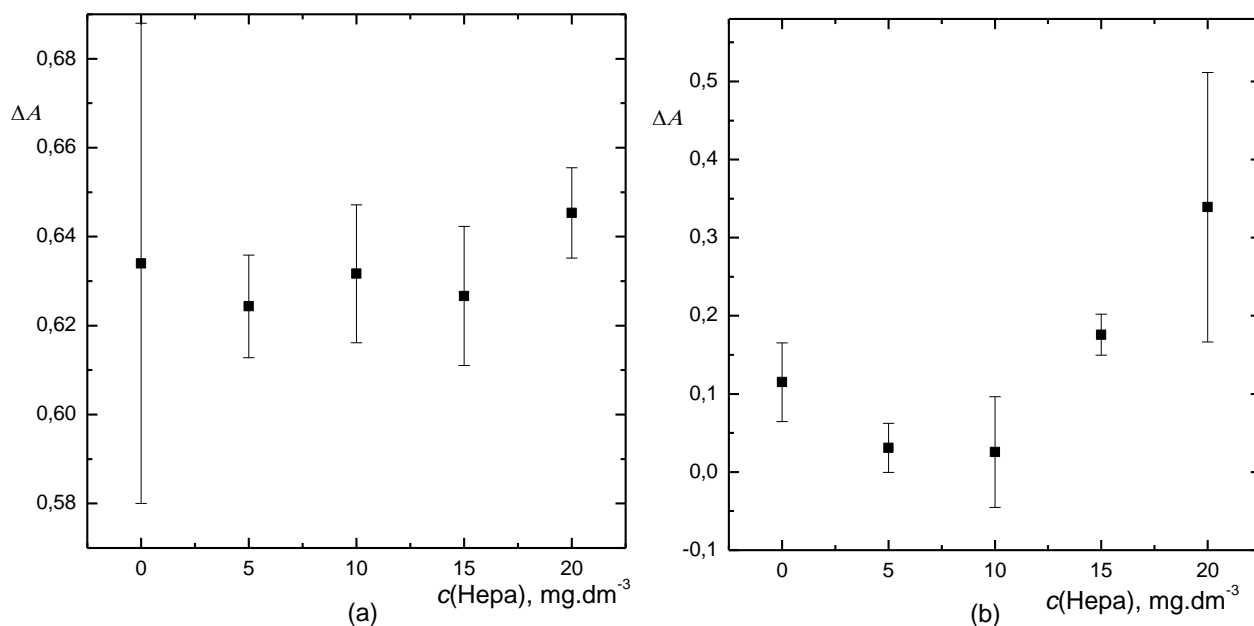
Při tomto experimentu bylo zjišťováno, jak výrazně ovlivní stanovení heparinu komplexní biologická matrice. Jako příklady matrice byly vybrány moč a krevní plasma. Bylo připraveno pět zkumavek. Do jednoho mililitru vzorku plasmy zbavené bílkovin (postup je uveden v kapitole 3.4 str. 19) bylo přidáno 0; 10; 20; 30 a 40 μl zásobního roztoku heparinu, který měl koncentraci $100 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$, tak aby výsledné koncentrace heparinu ve vzorku byly 0; 1; 2; 3 a $4 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$.

V další části experimentu byl aplikován podobný postup. Byl připraven desetkrát koncentrovanější zásobní roztok heparinu ($1 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$) a výsledné koncentrace ve vzorku plasmy byly 0, 5, 10, 15 a $20 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$. Graf s výsledky měření se nachází na Obr. 4.8 str. 32.



Obr. 4.8 Srovnání kalibračních bodů heparinu ve vzorku lidské krevní plasmy. Signál ΔA je rozdíl absorbance připraveného vzorku plasmy s přidavkem heparinu a methylenové modři měřené programem Blank. (a) Kalibrační body s koncentracemi heparinu ve vzorku 0 až 4 $\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}$; (b) Kalibrační body s koncentracemi heparinu ve vzorku 0 až 20 $\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Vzorek moči nebyl před analýzou upravován. Měření byla provedena v desetkrát ředěném vzorku a v neředěném vzorku moči. Do jednoho mililitru vzorku moči bylo pipetováno 0, 5, 10, 15 a 20 μl zásobního roztoku heparinu o koncentraci 1 $\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$, aby výsledné koncentrace v ředěném i neředěném vzorku moči byly 0, 5, 10, 15 a 20 $\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}$. Graf s výsledky se nachází na Obr. 4.9 str. 33.



Obr. 4.9 Kalibrační graf heparinu (a) v 10x ředěném a (b) v neředěném vzorku moči.

Při kalibračním měření heparinu v plasmě bylo zjištěno, že signál není přímo úměrný koncentraci heparinu ve vzorku, což je předpoklad pro stanovení heparinu spektrofotometrickou detekcí. Navíc hodnoty směrodatných odchylek jsou velmi vysoké. Důvodem mohou být velké interindividuální rozdíly mezi jednotlivými vzorky plasmy a velmi komplexní matricí, případně nevhodný postup při odstraňování bílkovin.

Při stanovení kalibrační závislosti heparinu v ředěné moči se rozdíl absorbancí téměř neměnil a kolísal mezi hodnotami 0,624 a 0,645. Při měření neředěného vzorku rozdíl v nižších přídavcích klesal, poté začal stoupat.

Vzhledem k tomu, že přímá úměra mezi rozdílem absorbancí methylenové modři a absorbancí připraveného vzorku a mezi koncentrací heparinu je předpokladem ke stanovení heparinu v plasmě nebo moči a tím i stanovení jeho interferentů, nebyla interferenční studie dokončena z důvodu nenalezení této úměry.

5. Závěr

Cílem práce bylo najít a stanovit látky, které mají rušivý vliv na analýzu heparinu v krevní plasmě. Měření byla prováděna s methylenovou modří a heparinem o koncentracích, které byly v kalibračních závislostech vyhodnoceny jako optimální. Při měření ve vodných roztocích a v kalibračních řadách se jako látka mající vliv na stanovení heparinu jevil chlorid sodný, který se v plasmě nachází v relativně vysokých koncentracích (přibližně $122 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$). Ve vodných roztocích výrazně potlačoval signál heparinu.

V kalibračních řadách v reálných vzorcích plasmy se ukázalo, že odezva není přímo úměrná přidanému heparinu, proto nebyly interferenty dále zkoumány, neboť na této závislosti je postaveno celé stanovení heparinu a tudíž i jeho interferentů. Vytyčený cíl práce tedy nebyl naplněn.

Z měření vyplynulo, že tímto postupem nelze stanovit heparin v biologických vzorcích přímo technikou SIA, ale je potřeba komplexnější úprava krevní plasmy nebo moči.

Je tedy zapotřebí mnohem rozsáhlejší studie interferencí, neboť tato práce se specializovala na anorganické látky obsažené v plasmě, a to především ionty. Matrice plasmy i moči je velmi komplexní a vzorek od vzorku se může v koncentracích jednotlivých látek lišit. Plasma obsahuje množství látek bílkovinné povahy a je možné, že mohou mít zásadní vliv na toto stanovení.

Reference:

1. Sagent Pharmaceuticals: *Heparin Sodium Injection, USP*, Dostupné z URL <<http://www.drugs.com/pro/heparin.html>> [cit. 21.2.2015]
2. Matouš, B.; Bubnová, E.; Buděšínská A.; Černý R.; Kazda A.; Kleibl, Z.; Kotyza, J.; Křemen, J.; Kvasnička, J.; Pelouch, J.; Štípek, S.; Zima, T.: *Základy lékařské chemie a biochemie*
3. Beni, S.; Limtiaco, J. F. K.; Larive, C. K.: Analysis and characterization of heparin impurities, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 399:2, 527–539 (2010)
4. Jakubowska, M.; Adamus, J.; Gębicki, J.; Marcinek, A.; Sikora, A.: Pulse radiolysis and spectrophotometric studies on the binding of organic cations with heparin, *Radiation physics and chemistry*, 99, 6–11 (2014)
5. Hirsh, J.; Warkentin, T. E.; Shaughnessy, S. G.; Anand, S. S.; Halperin, J. L.; Raschke, R.; Granger, Ch.; Ohman, M.; Dalen, J. E.: Heparin and low-molecular-weight heparin mechanisms of action, pharmacokinetics, dosing, monitoring, efficacy and safety, *Chest Journal*, 119:1, 64–94 (2001)
6. Lincová, D.; Farghali, H. et al.: *Základní a aplikovaná farmakologie*, 2. přeprac. vyd. Praha, Galén (2007)
7. Bergqvist, D.: Low molecular weight heparins, *Journal of Internal Medicine*, 240, 63–72 (1996)
8. Cosmi, B.; Hirsh, J.: Low molecular weight heparins *Current Opinion in Cardiology* [on line dokument] Dostupné u URL: <http://journals.lww.com/co-cardiology/Abstract/1994/09000/Low_molecular_weight_heparins.17.aspx> [cit. 24.2.2015]
9. Chlumský, J. et al.: *Antikoagulační léčba*, Praha, Grada Publishing (2005)
10. Hynie, S.: *Speciální farmakologie 4. díl*, Praha, Karolinum (2001)
11. Liang, T.; Shouzhuo, Y.; Qingji, X.: Electrochemical determination of heparin using methylene blue probe and study on competition of Ba²⁺ with methylene blue for binding heparin, *Talanta*, 71, 827–832 (2007)
12. Hirsh, J.; Levine, M. N.: Low molecular weight heparin, *The Journal of The American Society of Hematology*, 79:1, 1–17 (1992)
13. Lüllman-Rauch, R.: *Taschenlehrbuch Histologie 3. vyd.*, Stuttgart, Georg Thieme Verlag (2009)

14. Fontana, J.; Trnka, J.; Maďa, P.; Ivák, P.; Lavříková, P.; Nováková, L.; Pavelka, M.; Šajdíková, M.: *Funkce buněk a lidského těla* [multimediální on-line skripta] Dostupné z URL < <http://fbt.cz> > [cit. 14.4.2015]
15. Sherwood, L.: *Human physiology: From Cells to Systems 7. edition*, Belmont, Brooks/Cole (2010)
16. Kittnar, O. a kol.: *Lékařská fyziologie*, Praha, Grada Publishing (2011)
17. Trojan, S. a kol.: *Lékařská fyziologie 4. přeprac. vyd.*, Praha, Grada Publishing (2003)
18. European Medicines Agency: *Assessment report Methylthioninium chloride Proveblue* [on-line] Dostupné z URL <http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Public_assessment_report/human/002108/WC500107131.pdf> [cit. 15.4.2015]
19. U.S. National Library of Medicine: Methylene blue [on-line dokument] dostupné z URL <<http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search2/f?./temp/~mPKRTp:3>> [cit. 1.4.2015]
20. Panizza, M.; Barbucci, A.; Ricotti, R.; Cerisola, G.: Electrochemical degradation of methylene blue, *Separation and Purification Technology*, 54:3, 382–387 (2007)
21. Qingcai, J.; Qian, L.: Characterization of the interaction between methylene blue and glycosaminoglycans, *Spectrochimica Acta part A*, 55, 1667–1673 (1999)
22. Qian, L.; Qingcai, J.: Mechanism of methylene blue action and interference in the heparin assay, *Spectroscopy Letters*, 31:5, 913–924 (1998)
23. Oms, M.T.; Cerdà, A.; Cerdà, V.: Sequential injection analysis of nitrites and nitrates, *Analytica Chimica Acta*, 315, 312–330 (1995)
24. FIALab®: *Sequential Injection Analysis* on-line, Dostupné z URL <http://flowinjection.com/images/Sequential_Injection.pdf> [cit. 1.3.2015]
25. Ruzicka, J.; Hansen, E. H.; Starzynski, A. (ed.): *Flow Injection Analysis on-line*, Dostupné z URL <<http://flowinjectiontutorial.com/Methods%202.2.1.%20PRINCIPLES.html>> [cit. 9.3.2015]
26. Solich, P.; Polášek, M.; Klimundová, J.; Ruzicka, J.: Sequential injection technique applied to pharmaceutical analysis, *Trends in Analytical Chemistry*, 22:7, 116–126 (2003)
27. Hansen, E. H.: *New Trends in Flow Injection Analysis: Exploitation of Sequential and Lab-on-Valve Schemes*, Danish National Research Database, Dostupné z URL

- <<http://forskningsbasen.deff.dk/Share.external?sp=S013a5e5d-1bb9-4c74-af3f-f485eccea884&sp=Sdtu>> [cit. 10.4.2015]
28. Ruzicka, J.: Lab-on valve: Universal microflow analyzer based on sequential and bead injection, *Analyst*, 125:6, 1053–1060 (2000)
 29. Wang, J.; Hansen, E. H.: Sequential injection lab-on-valve: the third generation of flow injection analysis, *Trends in Analytical Chemistry*, 22:4, 225–231 (2003)
 30. Klouda, P.: *Moderní analytické metody 2.vyd.*, Ostrava, Pavel Klouda (2003)
 31. Opekar, F.; Jelínek, I.; Rychlovský, P.; Plzák, Z.: *Základní analytická chemie*, Praha, Karolinum (2002)
 32. Drbal, K.; Křížek, M.: *Analytická chemie*, Jihočeská Univerzita v Českých Budějovicích zemědělská fakulta (1999)
 33. Chen, Z.; Deutsch, T. G.; Dinh, H. N.; Domen, K.; Emery, K.; Forman A. J.; Gaillard, N.; Garland, R.; Heske, C.; Jaramillo, T. F.; Kleiman-Shwarscstein, A.; Miller, E.; Takanabe, K.; Turner, J.: *Photoelectrochemical Water Splitting*, Springer (2013)
 34. Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Crouch, S. R.: *Principles of Instrumental Analysis 6. vyd.*, Thomson Brooks/Cole, Belmont, USA (2007)
 35. Lišková, R.: *Stanovení heparinu technikou sekvenční injekční analýzy se spektrofotometrickou detekcí*, bakalářská práce, PřF UK, Praha (2014)
 36. Reiterová, E.: *Základy statistiky pro studenty psychologie*, Univerzita Palackého v Olomouci (2009)
 37. Cyhelský, L.; Souček, E.: *Základy statistiky*, Praha, Vysoká škola finanční a správní (2009)
 38. Pohanka, M.: *Základy statistiky laboratorních experimentů*, Hradec Králové, Univerzita obrany (2010)